

1B

IDS. #6

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2001年9月13日 (13.09.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/66736 A1

69/972/288

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 14/78, 16/18
 (71) 出願人 および
 (72) 発明者: 高橋健一 (TAKAHASHI, Kenichi) [JP/JP]; 〒655-0854 兵庫県神戸市垂水区桃山台1-16 JCRコート310 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01871
 (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高井義美 (TAKAI, Yoshimi) [JP/JP]; 〒651-2102 兵庫県神戸市西区学園東町2丁目5番地の73 Hyogo (JP). 中西宏之 (NAKANISHI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒651-2103 兵庫県神戸市西区学園西町2丁目5番地の110 Hyogo (JP). 佐藤啓子 (SATO, Keiko) [JP/JP]; 〒651-2112 兵庫県神戸市西区大津和2丁目8番地の9 シティーガーデン神戸伊川谷302 Hyogo (JP).
- (22) 国際出願日: 2001年3月9日 (09.03.2001)
 (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
 (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2000-065595 2000年3月9日 (09.03.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

/続葉有/

(54) Title: PROTEINS NECTIN-3

(54) 発明の名称: 蛋白質ネクチン-3

(57) Abstract: Proteins nectin-3 having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:2, 4 and 6 which are novel proteins belonging to the nectin protein family participating in the adhesion between cells; polynucleotides encoding these proteins nectin-3 and having the base sequences respectively represented by SEQ ID NOS:1, 3 and 5; recombinant vectors having these polynucleotides; and antibodies against the above-described proteins nectin-3. The proteins nectin-3 not only provide important information in clarifying the whole molecular mechanism of cell adhesion but potentially relate to the clarification of, for example, the infiltration and metastasis mechanisms of cancer, thereby being useful in diagnosing the malignancy of cancer, developing methods of preventing and treating the same and remedies, etc. therefor.

(57) 要約:

この出願は、細胞-細胞間接着結合に関するネクチン蛋白質ファミリーに属する新規な蛋白質として、配列番号2、4または6のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3を提供する。また、ネクチン-3をコードし、配列番号1、3、5の塩基配列をそれぞれ有するポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター、並びに前記の蛋白質ネクチン-3に対する抗体を提供する。蛋白質ネクチン-3は、細胞結合の分子機構の全容を解明するための重要な情報を提供するばかりか、例えば癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性もあり、癌腫の悪性度の診断やその予防・治療法、治療薬等の開発に有用である。

WO 01/66736 A1





(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイド」を参照。

添付公開書類:

— 國際調査報告書

明細書

蛋白質ネクチン-3

5

技術分野

この出願の発明は、カドヘリン (cadherin) を介した細胞接着結合に関する新規な蛋白質ネクチン-3と、これらの蛋白質を取得、利用するための遺伝子工学材料等に関するものである。

10

背景技術

動物個体における様々な細胞現象、例えば、細胞接着、細胞運動および細胞の形状決定等においては、細胞接着分子、受容体およびチャンネル等の膜貫通蛋白質によって形成される接着装置が重要な役割を果たしている。なかでも細胞の接着結合 (adherens junction: AJ) は、組織の整合性を維持するのに欠くことのできない役割を担っている。このような機構的役割に加えて、AJ は細胞増殖や組織の形態形成のコントロールに関わっているという証拠が増えてきている。また、多くの F-アクチ

15 結合タンパク質がアクチン細胞骨格を接着分子に連結するリンカーの役目を果たしていることが明らかにされてきている。しかしながら AJ の分子的な理解は不十分であり、どのような分子がアクチン細胞骨格を細胞膜に結合させているかは明らかではなかった。

20 25 この点を明らかにするため、この出願の発明者等は、ラットの脳から幾つかの新規な F-アクチン結合蛋白質を単離し、特に神経細胞に特異的で、シナプスに多く存在する蛋白質の構造を解析し、「ニューラビン」 (neurabin) と命名して既に特許出願している（特開平 10-276784 号公報）。さらにこの出願の発明者等は、新規の

F-アクチン結合タンパク質 I-アファディン (afadin) と、このトアファディンと結合する蛋白質ポンシンをそれぞれ単離し、特許出願している (I-アファディン：特開平 11-89572 号公報、ポンシン：特願平 11-174687 号)。そしてさらに、この出願の発明者等は、カドヘリンを介した AJ 形成に対してアファディンとともに機能する新規な蛋白質としてネクチン (nectin) -1 α 、-1 β およびネクチン-2 α 、-2 δ を特定している (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999)。これらのネクチン-1、2 は、Ca²⁺非依存性の免疫グロブリン様接着分子であり、アファディンおよびポンシンとともに、AJ 形成に 1 つの系として作用することを見出している (Genes Cells 4:573-581, 1999; J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)。

10

細胞接着の分子機構を解明することは、例えば、癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性があり、癌腫の悪性度の診断やその治療法、治療薬等の開発への応用も期待される。そして、そのなような解明のためには、細胞接着に関与する分子の全貌を明らかにする必要がある。

15

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞-細胞間接着結合に関与する新規な蛋白質を提供することを課題としている。

また、この発明は、この蛋白質を遺伝子工学的に生産するための材料を提供することも課題としている。

発明の開示

25 この出願は、上記の課題を解決するものとして、配列番号 2、4 および 6 のそれぞれのアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3 を提供する。

この蛋白質ネクチン-3 は、マウス由来の蛋白質であって、マウスのゲノム遺伝子から発現される 3 種類のスプライシングバリエントである (以下、それぞれネク

チン-3 α 、ネクチン-3 β 、ネクチン-3 γ と記載する)。

この出願は、また、前記発明の蛋白質ネクチン-3をコードするポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドには、ゲノム DNA、mRNA、cDNA 等が含まれる。

この出願は、さらに、3種類のネクチン-3をコードする cDNA として、配列番号 1、3 および 5 のそれぞれの塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供する。

10 さらにこの出願は、前記発明)のいずれかのポリヌクレオチドを保有する組換えベクターを提供する。

またこの出願は、前記の3種類の蛋白質ネクチン-3のいずれかに対する抗体を提供する。

15 なお、この発明のネクチン-3は、ネクチン-1 および ネクチン-2 と同様に、全ての哺乳動物に共通して存在する蛋白質であることから、前記の蛋白質ネクチン-3、およびこれらをコードするポリヌクレオチドはマウス由来のものに限定されるものではない。

20

図面の簡単な説明

図 1 は、ネクチン-3 α 、-2 β および -3 γ のアミノ酸配列の比較図である。
25 背景黒領域は 3 つのバリエントでの共通配列、背景灰色領域はネクチン-3 β と -3 γ での共通配列、下線はシグナルペプチド、2重下線は膜貫通領域、星印はアスパラギンのグリコシル化部位を示す。

図 2 は、ネクチン-3 α の trans homo-interaction を確認した結果である。(A)

はネクチン-3 α の発現レベルであり、細胞の溶出物を SDS-PAGE に展開し、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いてウエスタンプロット分析した。(B) は細胞凝集活性であり、○は親 L 細胞株、●はネクチン-3 α 発現 L 細胞株である。

(C) は細胞凝集活性であり、C 1 は親 L 細胞株、C 2 はネクチン-2 α 発現 L 細胞株である。バーは 100 μm を示す。

図 3 は、ネクチン-3 α の cis homo-dimer 形成を確認した結果である。ネクチン-3 α 発現細胞を B S 3 の存在下または非存在下でインキュベートし、各細胞溶出物を SDS-PAGE に展開し、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いてウエスタンプロット分析した。矢印は単量体、矢頭は 2 量体を示す。

図 4 は、混合細胞凝集活性を調べた結果である。A 1 - A 3 は標識化ネクチン-1 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 細胞株；B 1 - B 3 は標識化ネクチン-3 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-1 α 発現 L 細胞株；C 1 - C 3 は標識化ネクチン-3 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 細胞株；A 1、B 1、C 1 は干渉コントラスト顕微鏡画像；A 2、B 2、C 2 は蛍光顕微鏡画像；A 3、B 3、C 3 は統計分析の結果である。バーは 40 μm を示す。

図 5 は、2 種類の L 細胞株の共培養の免疫蛍光顕微鏡画像である。A 1 - A 3 はネクチン-1 α 発現 L 細胞株と -2 α 発現 L 細胞株；B 1 - B 3 はネクチン-3 α 発現 L 細胞株と -1 α 発現 L 細胞株；C 1 - C 3 はネクチン-3 α 発現 L 細胞株と -2 α 発現 L 細胞株；A 1、B 2 はネクチン-1 α ；A 2、C 2 はネクチン-2 α ；B 1 はネクチン-3 α (モノクローナル抗体)；C 1 はネクチン-3 α (ポリクローナル抗体)；A 3、B 3、C 3 は併用染色である。バーは 10 μm を示す。

図 6 は、trans hetero-interaction の親和性を確認した結果であり、2 細胞凝集の組成 (標識化細胞と陽標識化細胞) を定量的に分析した。A は標識化ネクチン-1 α 発現 L 紹細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 紹細胞株；B は標識化ネクチン-3 α 発現 L 紹細胞株と非標識化ネクチン-1 α 発現 L 紹細胞株；C は標識化ネクチン-3 α 発現 L 紹細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 紹細胞株である。

図 7 は、ネクチン-3 α とネクチン-1 α または -2 α との cis hetero-dimer 形成を調べた結果である。A は cis dimer 形成の比較である。A 1 はネクチン-1 α 発現

L細胞株（レーン1）と-1 α /3 α 発現L細胞株（レーン2）；A2はネクチン-2 α 発現L細胞株（レーン1）と-2 α /3 α 発現L細胞株（レーン2）である。Bは免疫沈降の結果であり、B1はネクチン-1 α /3 α 発現L細胞株、B2はネクチン-2 α /3 α 発現L細胞株、レーン1は細胞抽出物、レーン2は上清、レーン3は沈殿物である。矢印は単量体、矢頭は2量体である。

図8は、ネクチン-3の組織分布を調べた結果である。Aはネクチン-1、-2および-3のノーザンプロット分析の結果であり、A1はネクチン-1；A2はネクチン-2；A3はネクチン-3である。Bはネクチン-3 α 、-3 β および-3 γ のノーザンプロット分析の結果であり、B1はネクチン-3 α 、B2はネクチン-3 β 、B3はネクチン-3 γ である。レーン1は心臓、レーン2は脳、レーン3は脾臓、レーン4は肺、レーン5は肝臓、レーン6は骨格筋、レーン7は腎臓、レーン8は精巣である。

図9は、マウス小腸吸収上皮におけるネクチン-3 α の細胞内局在を調べた結果である。Aはネクチン-3 α ；Bはネクチン-2；Cは併用である。星印は小腸の内部空間を示す。バーは10 μ mである。

図10は、アファディンとネクチン-3 α との直接的な結合を調べた結果である。矢印は融合蛋白質GST-nectin-3 α -CP、矢頭は融合蛋白質MBP-afadin-PDZを示す。

20

発明を実施するための最良の形態

マウス蛋白質ネクチン-3 α は、配列番号1に塩基配列を示した1650bpのcDNAにコードされた蛋白質であり、配列番号2に示した549のアミノ酸配列を有している。また、このネクチン-3 α の全cDNAは、配列番号7に示した2178bpの塩基配列を有している。

ネクチン-3 β は、配列番号3に塩基配列を示した1533bpのcDNAにコードされた蛋白質であり、配列番号4に示した510のアミノ酸配列を有している。

ネクチン-3 α は、配列番号5に塩基配列を示した1317bpのcDNAにコードされた蛋白質であり、配列番号6に示した438のアミノ酸配列を有している。

5 これらの蛋白質ネクチン-3は公知の方法により、マウスやその他の哺乳動物組織から単離する方法、この発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは発明によって提供されるポリヌクレオチドを用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換えDNA技術によってネクチン-3を取得する場合には、ネクチン-3を
10 コードするポリヌクレオチドを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鑄型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また各ポリヌクレオチドを公知の方法により適当な発現ベクターに組換えれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動植物細胞等で、ポリヌクレオチドがコードするネクチン-3を大量に発現させることができる。

15

この発明の蛋白質ネクチン-3を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のポリヌクレオチドを挿入結合して組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を
20 形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、ポリヌクレオチドがコードしているネクチン-3を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。得られた融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって、ポリヌクレオチドがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。

25

この発明の蛋白質ネクチン-3を動物細胞で発現させる場合には、この発明のポリヌクレオチドを、動物細胞用プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入すれば、この発

明の蛋白質ネクチンー3を動物細胞内で発現できる。

以上のとおり方法によって得られるマウス蛋白質ネクチンー3は、例えば、この蛋白質を特異的に認識する抗体を作成するための抗原として使用することができる。

5

蛋白質ネクチンー3には、配列番号2、4または6で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片もまた抗体を作製するための抗原として用いることができる。

10 この発明のポリヌクレオチドは、前記の蛋白質ネクチンー3 α 、 β および γ をコードする哺乳動物のゲノム遺伝子であって、例えば、配列番号1、3または5の塩基配列を有するポリヌクレオチドまたはその一部配列をプローブとして、既存のゲノムライブラリー等から単離することができる。

15 この発明のポリヌクレオチドはまた、配列番号1、3または5で表される塩基配列を有することを特徴とするcDNAであり、前記ネクチンー3 α 、 β および γ をそれぞれコードしている。これらのポリヌクレオチドは、配列番号1、3または5の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、マウスやその他の哺乳動物cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明のポリヌクレオチドと同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて、目的ポリヌクレオチドを合成することもできる。

一般に哺乳動物の遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1、3または5において、1または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされているポリヌクレオチドもこの発明に含まれる。同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および／または他のアミノ酸残基による置換がなされている蛋白質も、

配列番号 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、この発明に含まれる。

この発明のポリヌクレオチドには、配列番号 1、3 または 5 で表される塩基配列 5 のいかなる部分塩基配列を含む DNA 断片 (10bp 以上)、あるいはそれらのアンチセンス鎖からなるポリヌクレオチドも含まれる。

この発明の抗体は、蛋白質ネクチン-3 それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。
10

以下、実施例として、この発明のネクチン-3 の構造とその機能確認について行った実験結果を示す。

15

実施例

1. 方法

20 1. 1 マウス・ネクチン-3 cDNA の分子クローニング

EST データベースから、ネクチン-1 および -2 に類似しているが、同一ではない 3 種類のマウス EST クローン (AI1428160, AA492633, AA497887) をマウス脳 cDNA (Clontech 社) から PCR 増幅した。これら cDNA 混合物をプローブとして用いてマウス cDNA ライブラリー (Stratagene 社) をスクリーニングし、全長 cDNA 25 を得た。塩基配列の決定は、DNA sequencer (ABI 373) を用いて行った。

1. 2 ネクチン-3 発現ベクターの構築

ベクター pCAGIPuro (J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)、pCAGIPuro-FLAG、

pGEX-KG (Anal. Biochem. 192:262-267, 1991)、pMal-C2 (New England Biolabs Inc.) および pFastBac1-Msp-Fc (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999) を用いて以下のネクチン-3 発現ベクターを構築した。なお、pCAGIPuro-FLAG は、prepro-trypsin シグナルペプチドと pFLAG-CMV1 (Eastman Kodak Co.) の FLAG エピトープを 5 pCAGIPuro にサブクローニングすることによって作成した。

- (a)pCAGIPuro-nectin-3 α : 配列番号 2 の 1 - 549 (全長)
- (b)pCAGIPuro-FLAG-nectin-3 α : 配列番号 2 の 56 - 549
- (c)GST-nectin-3 α -CP : 配列番号 2 の 433 - 549 (細胞質領域)
- 10 (d)GST-nectin-3 α -CP- Δ C : 配列番号 2 の 433 - 545 (C 端 4 アミノ酸残基の欠失)
- (e)GST-nectin-3 γ -CP : 配列番号 6 の 397 - 438 (細胞質領域)
- (f)pFastBac1-Msp-Fc-nectin-3 α -EX : 配列番号 2 の 56 - 400 (細胞外領域)

1. 3 形質転換細胞の構築

15 L 細胞 (京都大学より入手) を 10% ウシ胎児血清含有の D M E M 培地で培養し、形質転換 L 細胞を作成した。全長ヒト・ネクチン-1 α を発現する L 細胞株 (nectin-1 α -L cells) または全長マウス・ネクチン-2 α を発現する L 細胞株 (nectin-2 α -L cells) は、それぞれ文献 (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000) に記載の方法で作成した。全長マウス・ネクチン-3 α 20 を発現する L 細胞株 (nectin-3 α -L cells) は、組換え体ベクター pCAGIPuro-nectin-3 α を用いて作成した。ネクチン-1 α と FLAG-ネクチン-3 α を共に発現する細胞株 (nectin-1 α /3 α -L cells)、またはネクチン-2 α と FLAG-ネクチン-3 α を共に発現する細胞株 (nectin-2 α /3 α -L cells) は、それぞれ、細胞株 (nectin-1 α -L cells および nectin-2 α -L cells) に、Lipofectamine reagent (GIBCO BRL) を用いて、 25 pCAGIPuro-FLAG-nectin-3 α をトランスフェクションすることによって作成した。各細胞株は、1 日培養後、培地を交換し、5 μ g/ml の puromycin (Sigma Chemical Co.) によって選択した。

1. 4 抗体の作成

ネクチン-3 α に対するウサギ抗血清（ポリクローナル抗体）を、GST-nectin-3 α -CP を抗原として作成した。ネクチン-3 に対するラットモノクローナル抗体は、ネクチン-3 α の細胞外領域と IgG Fc との融合蛋白質を抗原として作成した。ウサギ
5 抗ネクチン-1 α ポリクローナル抗体は文献 (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999) に記載の方法で作成した。また、ネクチン-1 α のアミノ酸位置 450-468 に対応する合
成ペプチドを抗原としてウサギ抗ネクチン-1 α ポリクローナル抗体を文献 (J. Cell
Biol. 145:539-549, 1999) に記載の方法により作成した。さらに、ラット抗ネクチン
-2 モノクローナル抗体を文献 (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, Exp. Cell Res.
10 235:374-384, 1997) に記載の方法で、また、マウス・モノクローナルおよびウサ
ギ・ポリクローナル抗-T-アファディン抗体を文献 (J. Cell Biol. 139:517-528, 1997,
Oncogene 18:1609-1618, 1999) に記載の方法で作成した。ラット抗 E-カドヘリン
モノクローナル抗体は竹市博士（京都大学）から供与された。マウス抗 FLAG モノ
クローナル抗体は Eastman Codak より購入した。

15

1. 5 その他の方法

細胞凝集アッセイ (Cell Aggregation Assay) は、文献 (J. Cell Biol. 145:539-549,
1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000) に記載の方法に従って行った。また、2
種類の L 細胞株間での混合細胞凝集アッセイは、文献 (J. Cell Biol. 103:171-187,
20 1986) の記載に従い、一方の L 細胞株を Dil (Molecular Probe Inc. USA) によって事
前標識して行った。

化学的交叉結合 (Chemical Cross-linking) は、文献 (Blood 92:4602-4611, 1998,
J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000) に記載の方法に従って行った。免疫沈降
(Immunoprecipitation) は、文献 (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem.
25 275:613-618, 2000) に記載の方法に従って行った。培養細胞の免疫蛍光顕微鏡観察
は、文献 (J. Cell Biol. 139:517-528, J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem.
275:613-618, 2000) に記載の方法に従って行った。蛋白質濃度の測定は、文献
(Anal. Biochem. 72:248-254, 1976) の記載に従って、ウシ血清アルブミンを対照と

する方法により行った。SDS-PAGE は文献 (Nature 227:680-685, 1970) の記載に従って行った。

また、アフィニティーコロマトグラフィーは以下のとおりに行った。アファディン PDZ ドメインの MBP 融合蛋白質は amylose resin beads (New England Biolabs 5 Inc.) に固定化した。GST-nectin-3 α -CP および GST-nectin-3 α -CP- Δ C はそれぞれアフィニティービーズに固定化した。これらのビーズを PBS (0.1% Triton X-100 含有) で十分に洗浄した後、PBS (20 mM maltose, 0.1% Triton X-100 含有) により溶出した。

10 2. 結果

2. 1 ネクチン-3 cDNA のクローニングとその特徴

マウス cDNA ライブラリーから得られた cDNA クローンは、配列番号 7 の塩基配列を有しており、1647bp からなる翻訳領域（配列番号 1）に 549 アミノ酸配列（配列番号 2）からなる蛋白質（推定分子量 60,580）をコードしていた。また、このクローンは前記 EST クローンを全て含んでいた。この蛋白質をネクチン-3 α と命名した。

このネクチン-3 α のアミノ酸配列は、N 端疎水性シグナルペプチド（配列番号 2 の位置 1-55）および膜貫通領域（配列番号 2 の位置 405-421）を有していた。また、N 結合型グリコシル化は位置 73、83、125、186、222 および 331 に見られた。また、このネクチン-3 は、細胞外領域に 3 つの Ig 様ドメインを含んでおり、細胞質領域には C 端保存モチーフを有していた（表 1）。

表1

C-Terminal sequences of the nectin family
members

5

10

Nectin-1 α	S F I S K K E W Y V
Nectin-1 β	V R T T E P R G E C
Nectin-2 α	S L I S R R A V Y V
Nectin-2 δ	D E F V S R A M Y V
Nectin-3 α	S V I S R R E W Y V
Nectin-3 β	L Y I N P R E H Y V
Nectin-3 γ	L G Q V R A L E D T

以上のとおりのネクチン-3 α の構造的な特徴は、ネクチン-1 α 、-1 β 、-2 α および-2 δ と類似している。ホモロジーの程度は領域によって異なるが、ネクチン-3 α の細胞外領域のアミノ酸配列は、ネクチン-1およびネクチン-2とそれぞれ35.9%および30.7%同一であった。

また、ネクチン-3 α を単離する過程で、2つのスプライシングバリエント（ネクチン-3 β および-3 γ ）が見出された。ネクチン-3 β のcDNA（翻訳領域）は1533bpの塩基配列（配列番号3）を有しており、510のアミノ酸配列（配列番号4）からなる蛋白質（推定分子量55,808）をコードしている。このネクチン-3 β の細胞外領域（配列番号4の位置1-357）はネクチン-3 α のそれと同一であるが、膜貫通領域および細胞質領域（配列番号4の位置358-510）はネクチン-3 α とは異なっている。しかし、ネクチン-3 β はC端保存モチーフを有していた（表1）。

ネクチン-3 γ のcDNA（翻訳領域）は1317bpの塩基配列（配列番号5）を有しており、438のアミノ酸配列（配列番号6）からなる蛋白質（推定分子量47,259）をコードしている。このネクチン-3 γ の細胞外領域、膜貫通領域および細胞質領域はネクチン-3 β と同一であるが、ネクチン-3 γ はC端保存モチーフを欠失し

ている（表1）。

図1は、以上のネクチン-3 α 、-3 β および-3 γ のアミノ酸配列（1文字記号）の比較図である。

なお、以下の実験では主としてネクチン-3 α を対象とする。その理由は、様々な組織を対象としたノーザンプロット分析の結果、ネクチン-3 α が主要なスライシングバリエントであることが確認されたからである（図8、B1-B3参照）。

2. 2 ネクチン-3 α のtrans Homo-Interaction と cis Homo-dimer Formation

nectin-1 α -L cells および nectin-2 α -L cells を用いた研究により、ネクチン-1 α およびネクチン-2 α が細胞-細胞接着活性（trans Homo-Interaction）を示すことが確認されている（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）。そこで先ず、ネクチン-3 α が同様の活性を有するか否かを調べた。抗ネクチン-3ポリクローナル抗体は、細胞株 nectin-3 α -L cells の発現産物について、分子量約 100 kDa の2つの蛋白質バンドを認識した（図2A、図3）。これらは、グリコシル化等の翻訳後修飾の違いによるものと考えられる。また、これらの分子量は、アミノ酸配列から推定される分子量とも異なるが、これもまたグリコシル化の相違によるものと考えられる。さらに、各細胞株におけるネクチン-1 α 、-2 α および-3 α の発現レベルは同等であった（データ示さず）。

次に、細胞株 nectin-3 α -L cells を用いてネクチン-3 α の細胞凝集活性を調べた。その結果、ネクチン-3 α は経時的に細胞凝集活性を示した（図2B、C1、C2）。この活性は EDTA 添加によって影響されないことから（データ示さず）、ネクチン-3 α の細胞-細胞接着活性は Ca²⁺非依存性であることが確認された。以上の結果から、ネクチン-3 α は、ネクチン-1 α 、-2 α および-2 δ と同様（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, Exp. Cell Res. 235:374-384, 1997, Blood 92:4602-4611, 1998, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）のCa²⁺非依存性のホモフィリック CAM（細胞接着分子）であることが確認された。

ネクチン-1 α および-2 α は cis homo-dimer を形成することが知られているので（J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）、ネクチン-3 α についても同様に活性につ

いて調べた。細胞株 nectin-3 α -L cells を単一細胞に分離し、細胞表面クロスリンカー-BS3 と共にインキュベートし、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いてウエスタンプロット分析を行った。その結果、2量体に対応する分子量約 200~220 kDa のバンドが確認された（図 3）。また、より高分子量のバンドも検出された。

5 この交叉結合は単一細胞懸濁により行ったので、このダイマーやオリゴマーは trans homo-interaction よりも cis homo-interaction によるものである可能性が高い。

2. 3 ネクチン-3 α とネクチン-1 α または-2 α との trans Hetero-interaction
ネクチンファミリーの各メンバーがヘテロフィリックな細胞-細胞接着活性
10 (trans hetero-interaction) を示すか否かを調べるため、混合細胞凝集アッセイを行った。Dil 標識された細胞株 nectin-1 α -L-cells が非標識 nectin-2 α -L-cells と混合された場合には、常に、標識細胞だけか、または非標識細胞だけが凝集し（図 4 A 1 - A 3）、両方の L 細胞株からなる凝集塊はほとんど検出されなかった。一方、Dil 標識された細胞株 nectin-3 α -L-cells が非標識細胞株 nectin-1 α -L-cells と混合された場合には、標識細胞と非標識細胞とからなる凝集塊が観察された（図 4 B 1 - B 3）。このことは、ネクチン-3 α がネクチン-1 α と trans hetero-interaction を形成することを示している。また、同様の結果が、ネクチン-3 α とネクチン-2 α についても得られた（図 4 C 1 - C 3）。

さらにこの結果を確認するため、免疫蛍光顕微鏡観察を行った。細胞株 nectin-1 α -L-cells と細胞株 nectin-2 α -L-cells とを共培養した場合には、ネクチン-1 α とネクチン-2 α は、それぞれの L 細胞株の細胞-細胞接触部位に局在していた（図 5 A 1 - A 3）が、ネクチン-1 α およびネクチン-2 α は 2 つの L 細胞株同士の接触部位には検出されなかった。一方、細胞株 nectin-3 α -L-cells と細胞株 nectin-1 α -L-cells とを共培養した場合には、ネクチン-3 α とネクチン-1 α は、2 つの L 細胞株同士の接触部位に共存していた（図 5 B 1 - B 3）。同様の結果は、細胞株 nectin-3 α -L-cells と細胞株 nectin-2 α -L-cells とを共培養した場合にも観察された（図 5 C 1 - C 3）。これらの結果から、ネクチン-3 α はネクチン-1 α および-2 α と trans hetero-interaction を形成するが、ネクチン-1 α と-2 α はそのよう

な相互作用を示さないことが確認された。

次に、ネクチンファミリーの各メンバーが、*trans homo-interaction* を形成するか、あるいは*trans hetero-interaction* を形成するかを調べるため、混合細胞凝集アッセイを用いて2種類の細胞凝集を分析した。4細胞凝集の結果と同様に、細胞株 nectin-1 α-L-cells と細胞株 nectin-2 α-L-cells とを混合した場合には、ホモ型の2細胞凝集が形成された（図6 A）。これに対して、細胞株 nectin-1 α-L-cells と細胞株 nectin-3 α-L-cells とを混合した場合にはヘテロ型の2細胞凝集が形成され、ホモ型の細胞凝集はほとんど観察されなかった（図6 B）。同様の結果は、細胞株 nectin-3 α-L-cells と細胞株 nectin-2 α-L-cells とを混合した場合にも観察された（図6 C）。以上の結果から、ネクチン-3 α とネクチン-1 α または-2 αとの*trans hetero-interaction* の親和性は、ネクチン-1 α、-2 α または-3 αの*trans homo-interaction* の親和性より明らかに強いことが確認された。

2. 4 ネクチン-3 αとネクチン-1 α または-2 αとの*cis* hetero-dimer 形成

ネクチン-3 αがネクチン-1 α または-2 αと*cis* hetero-dimer を形成するか否かを調べるため、細胞株 nectin-1 α/3 α-L cells および細胞株 nectin-2 α/3 α-L cells を用いて、FLAG-ネクチン-3 αをそれぞれ細胞株 nectin-1 α-L cells および細胞株 nectin-2 α-L cells で発現させた。その結果、FLAG-ネクチン-3 αは、ネクチン-1 α または-2 αの*cis* dimer のサイズを変えなかった（図7 A 1 およびA 2）。細胞株 nectin-1 α/3 α-L cells に細胞表面交叉結合を行い、次いで抗 FLAG モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行うと、ネクチン-1 αは上清中に回収され、FLAG-ネクチン-3 αとは共免疫沈降しなかった（図7 B 1）。同様の結果は細胞株 nectin-2 α/3 α-L cells においても得られた（図7 B 2）。以上の結果から、ネクチン-3 αは、ネクチン-1 α または-2 αとは*cis* hetero-dimer を形成しないことが確認された。

2. 5 ネクチン-3 αの組織分布および細胞内局在

以前の報告（J. Virol. 66:2807-2813, 1992, Gene 155:261-265, 1995, Gene

159:267-272, 1995) と同様に、ノーザンプロット分析の結果からは、ネクチン-1 は脳で優性に発現しており、ネクチン-2 は全身性に発現していた（図 8 A 1 および A 2）。ネクチン-3 の 3 種類のスプライシングバリエントに共通な翻訳領域をプローブとして用いたノーザンプロット分析では、様々な組織において幾つかの mRNA バンドが検出された（図 8 A 3）。そこで、各バリエントの組織分布を調べるために、各バリエントに特異的な cDNA プローブを用いた。ネクチン-3 α は約 5.2-kb、3.8-kb、3.3-kb および 2.7-kb の mRNA バンドを示し、これらは精巣で有意に発現し、他の組織（心臓、脳、肺、肝臓および腎臓）では僅かに発現していた（図 8 B 1）。ネクチン-3 β は約 5.2-kb および 3.3-kb の mRNA バンドを示し、これらは精巣で発現していた（図 8 B 2）。ネクチン-3 γ は精巣において約 3.3-kb の mRNA バンドを示し、肺、肝臓および腎臓において 2.1-kb の mRNA バンドを示した（図 8 B 3）。

次に、ネクチン-3 α の細胞内局在を調べるため、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いて免疫蛍光顕微鏡観察を行った。ネクチン-3 α は、マウス小腸吸収上皮の接着複合体領域にネクチン-2 と共に存在していた（図 9）。以上の結果から、ネクチン-2 と同様に（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999）、ネクチン-3 α もまたカドヘリン性細胞-細胞 AJs に局在していることが示唆された。

2. 6 ネクチン-3 とアファディンとの直接結合

ネクチン-3 α がアファディンと直接に結合するか否かを調べるため、アフィニティーコロマトグラフィーを行った。ネクチン-3 α の細胞質領域の GST 融合蛋白質（GST-nectin-3 α -CP）は、amylose resin beads に固定化された MBP-afadin-PDZ（アファディンの PDZ 領域との MBP 融合蛋白質）に結合した（図 10）。ネクチン-3 α のアファディンへの結合の化学量論は約 1 : 1 であった。これに対して、細胞質領域の C 端 4 アミノ酸残基を欠失したネクチン-3 α との GST 融合蛋白質（GST-nectin-3 α -CP- Δ C）は結合しなかった。同じく、C 端の保存モチーフを欠失しているネクチン-3 γ の細胞質領域との GST 融合蛋白質もアフィニティーピーズとは結合しなかった。

産業上の利用可能性

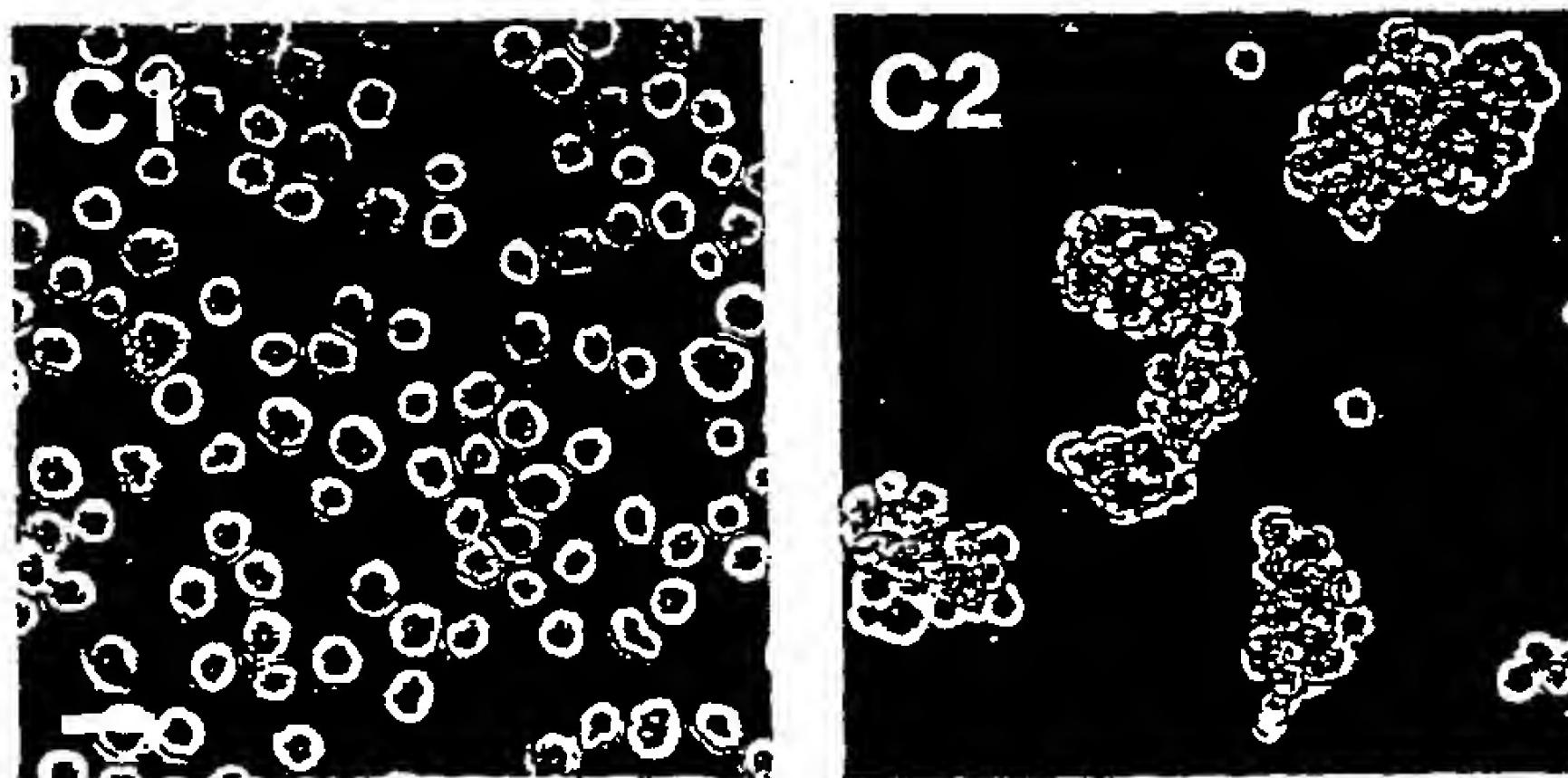
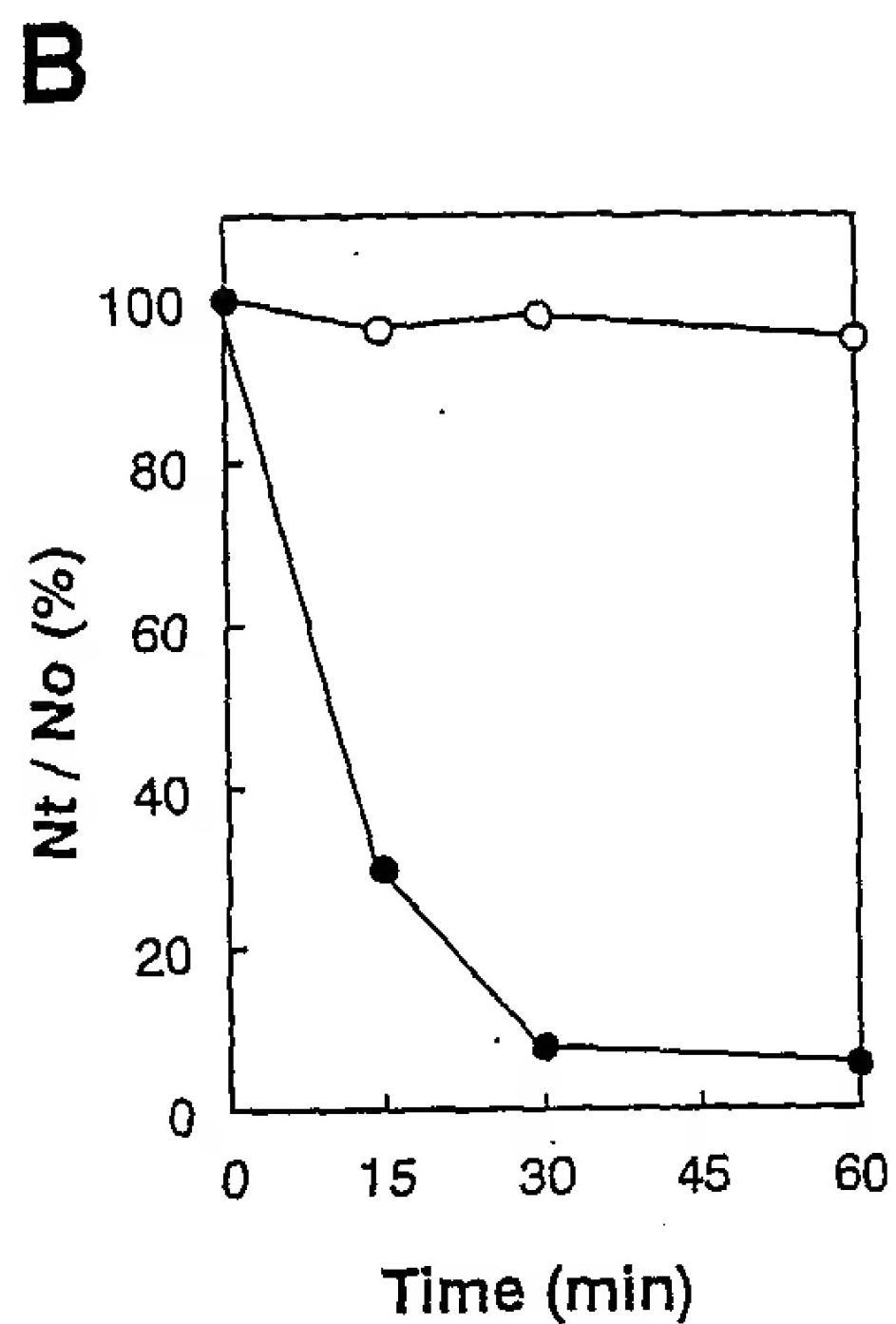
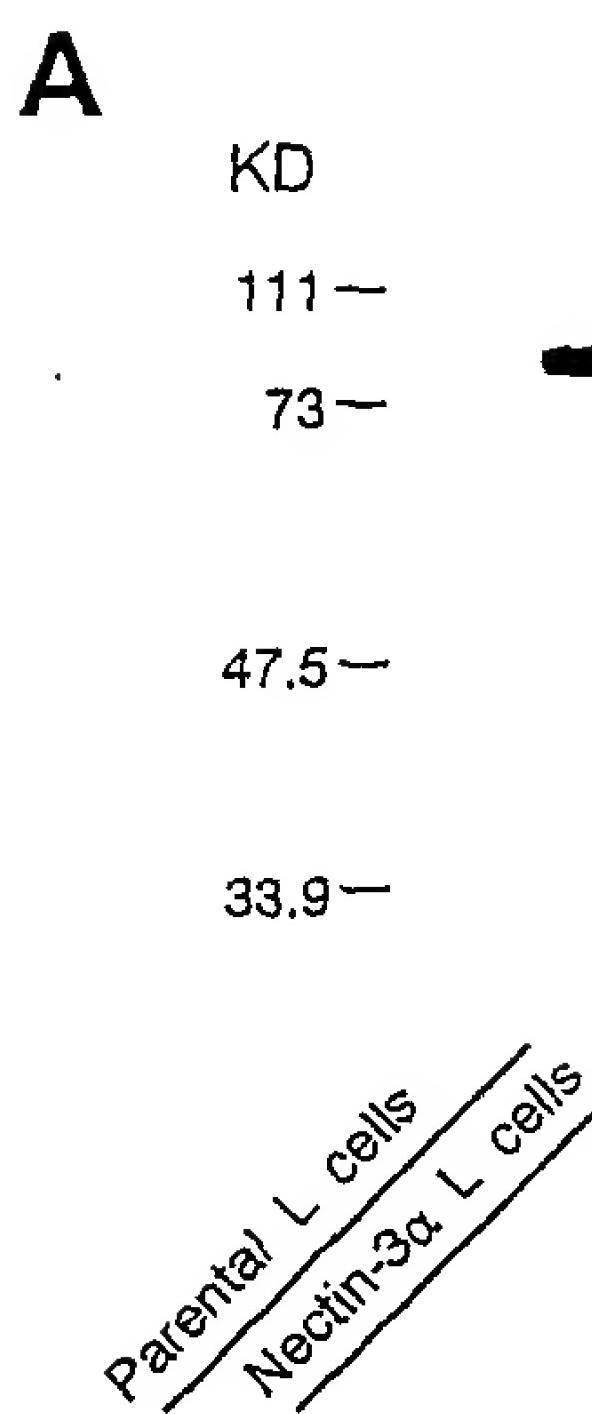
以上詳しく述べたとおり、この出願の発明によって、ネクチンー1 およびー2
5 と同一の蛋白質ファミリーに属する新規蛋白質ネクチンー3が提供される。この蛋白質は、細胞結合の分子機構の全容を解明するための重要な情報を提供するばかりか、例えば癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性もあり、癌腫の悪性度の診断やその予防・治療法、治療薬等の開発に有用である。

請求の範囲

1. 配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。
- 5 2. 配列番号4のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。
3. 配列番号6のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。
4. 請求項1から3のいずれかの蛋白質ネクチン-3をコードするポリヌクレオ
10 チド。
5. 配列番号1の塩基配列を有する請求項2のポリヌクレオチド。
6. 配列番号3の塩基配列を有する請求項2のポリヌクレオチド。
15
7. 配列番号5の塩基配列を有する請求項2のポリヌクレオチド。
8. 請求項4から7のいずれかのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター。
- 20 9. 請求項1から3のいずれかの蛋白質ネクチン-3に対する抗体。

Nectin-3 α	MARTPGPAPLCPGGGKAQILSSAFFPPAAGLLLPLLPAAPTTPPLLLPLLFSRLCCGALAGS!	60
Nectin-3 β	MARTPGPAPLCPGGGKAQILSSAFFPPAAGLLLPLLPAAPTTPPLLLPLLFSRLCCGALAGS!	60
Nectin-3 γ	MARTPGPAPLCPGGGKAQILSSAFFPPAAGLLLPLLPAAPTTPPLLLPLLFSRLCCGALAGS!	60
Nectin-3 α	I V E P H V T A V W G K N V S L K C L I E V N E T I T Q I S W E K I H G K S T Q T V A V H H P Q Y G F S V Q G D Y Q G R	120
Nectin-3 β	I V E P H V T A V W G K N V S L K C L I E V N E T I T Q I S W E K I H G K S T Q T V A V H H P Q Y G F S V Q G D Y Q G R	120
Nectin-3 γ	I V E P H V T A V W G K N V S L K C L I E V N E T I T Q I S W E K I H G K S T Q T V A V H H P Q Y G F S V Q G D Y Q G R	120
Nectin-3 α	V L F K N Y S L N D A T I T L H N I G F S D S G K Y I C K A V T F P L G N A Q S S T T V L V E P T V S L I K G P D S	180
Nectin-3 β	V L F K N Y S L N D A T I T L H N I G F S D S G K Y I C K A V T F P L G N A Q S S T T V L V E P T V S L I K G P D S	180
Nectin-3 γ	V L F K N Y S L N D A T I T L H N I G F S D S G K Y I C K A V T F P L G N A Q S S T T V L V E P T V S L I K G P D S	180
Nectin-3 α	L I D G G N E T V A A V C V A A T G K P V A Q I D W E G D L G E M E S S T T S F P N E T A T I V S Q Y K L F P T R F A R	240
Nectin-3 β	L I D G G N E T V A A V C V A A T G K P V A Q I D W E G D L G E M E S S T T S F P N E T A T I V S Q Y K L F P T R F A R	240
Nectin-3 γ	L I D G G N E T V A A V C V A A T G K P V A Q I D W E G D L G E M E S S T T S F P N E T A T I V S Q Y K L F P T R F A R	240
Nectin-3 α	G R R I T C V V K H P A L E K D I R Y S F I L D I Q Y A P E V S V T G Y D G N W F V G R K G V N L K C N A D A N F P P F	300
Nectin-3 β	G R R I T C V V K H P A L E K D I R Y S F I L D I Q Y A P E V S V T G Y D G N W F V G R K G V N L K C N A D A N F P P F	300
Nectin-3 γ	G R R I T C V V K H P A L E K D I R Y S F I L D I Q Y A P E V S V T G Y D G N W F V G R K G V N L K C N A D A N F P P F	300
Nectin-3 α	K S V V W S R L D G Q W P D G L L A S D N T L H F V H P L T V N Y S G V V C K V S N S L G Q R S D Q K V I Y I S D I P P T	360
Nectin-3 β	K S V V W S R L D G Q W P D G L L A S D N T L H F V H P L T V N Y S G V V C K V S N S L G Q R S D Q K V I Y I S D I P P T	360
Nectin-3 γ	K S V V W S R L D G Q W P D G L L A S D N T L H F V H P L T V N Y S G V V C K V S N S L G Q R S D Q K V I Y I S D I P P T	360
Nectin-3 α	T T T L Q P T V Q W H S S P A D V Q D I A T E H K K L P P F P L S T L A T L K D D T I G T I I A S V V G G A L F L V L V S	420
Nectin-3 β	T T T S S T I A V A G A V I G A V L A F I T T Y F V T V L L T P R K K K R P S Y L D K V I D L P P T H K P P V Y E E R I	420
Nectin-3 γ	T T T S S I A V A G A V I G A V L A F I T T V F V T V L L T P R K K K R P S Y L D K V I D L P P T H K P P V Y E E R I	420
Nectin-3 α	I L A G V F C Y R R R T F R G D Y F A K N Y I P P S O M Q A K E S Q I D V L H Q D E L D S Y P D S V K K E N K N P V N N	480
Nectin-3 β	P S L P Q K D D L G Q T E H L P L Q T Q F K E K G A G G L Q P S N G P I S R R F D Y E D E S T M Q E D G T Q R M C P L Y	480
Nectin-3 γ	P S L P Q K D D L G Q V R A L E D T	438
Nectin-3 α	L I R K D Y L E E P E K T Q W N N V E N L T R A F P M D Y Y E D L K M G M K F V S D E R Y N E S E D G L V S H V D G S	540
Nectin-3 β	S Q M C H Q D R S P R Q H H P R N P E R L Y I N P R E H Y V	510
Nectin-3 γ	V I S R R E W Y V	549

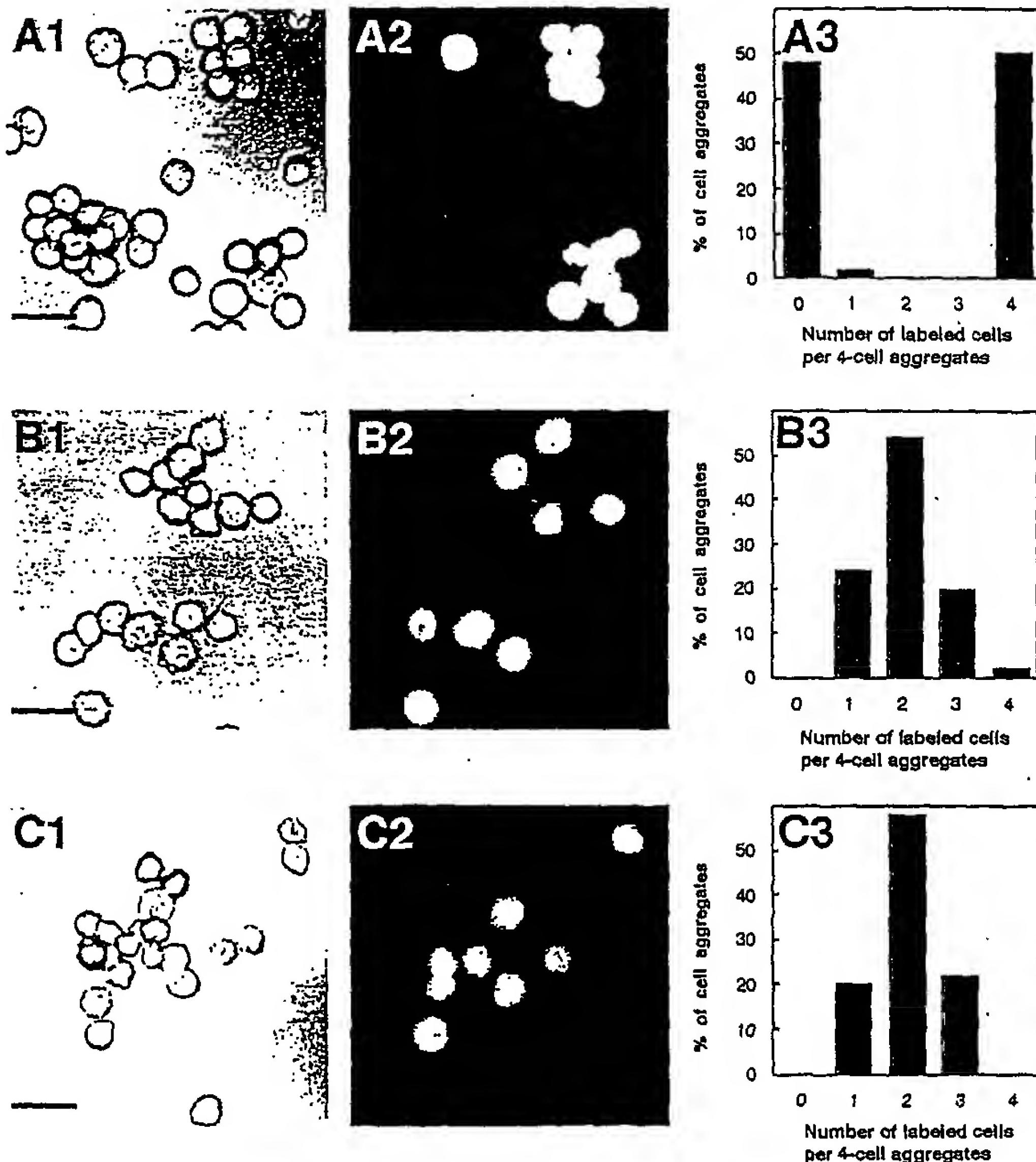
2/10
図 2



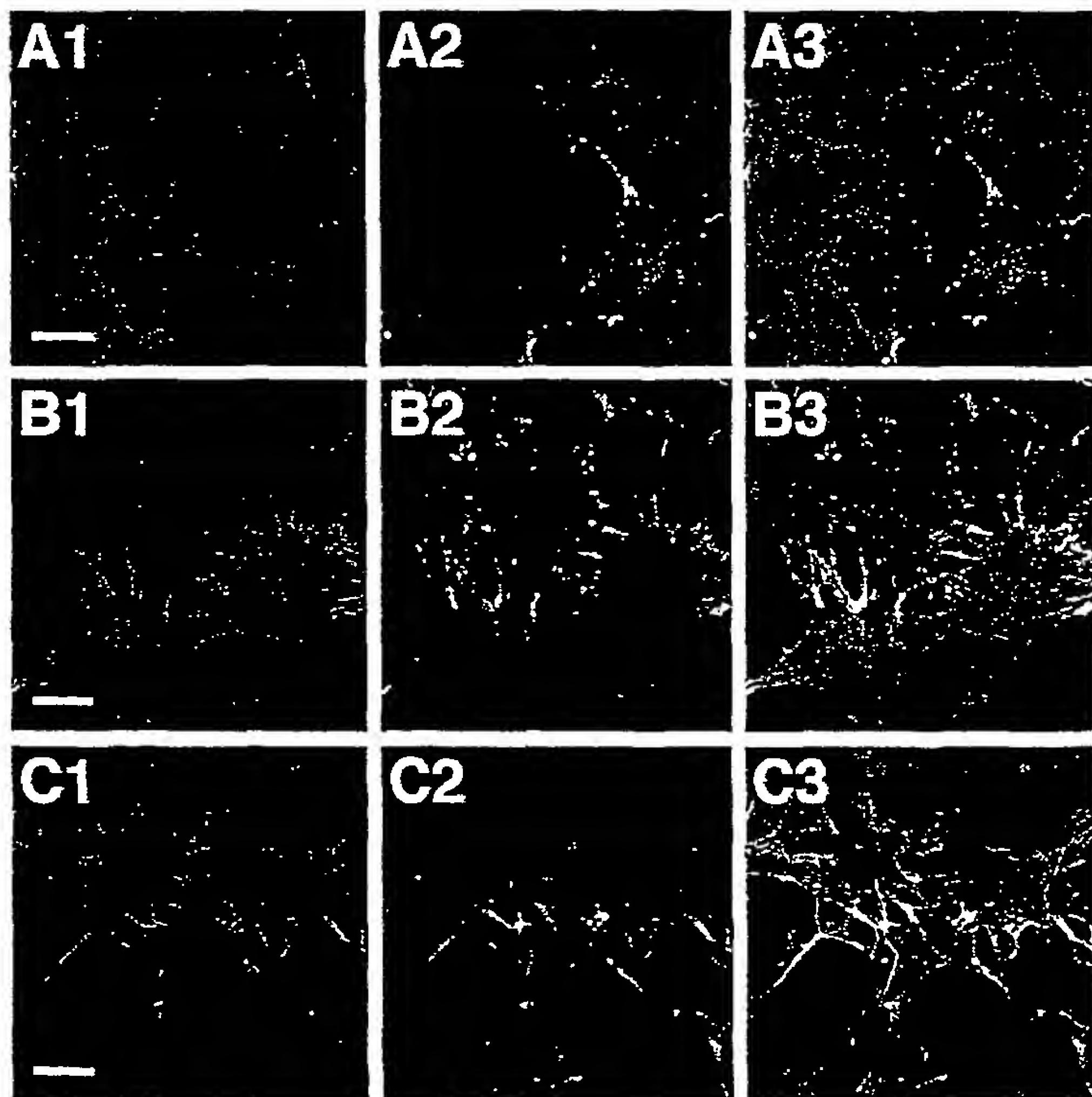
3/10
図 3

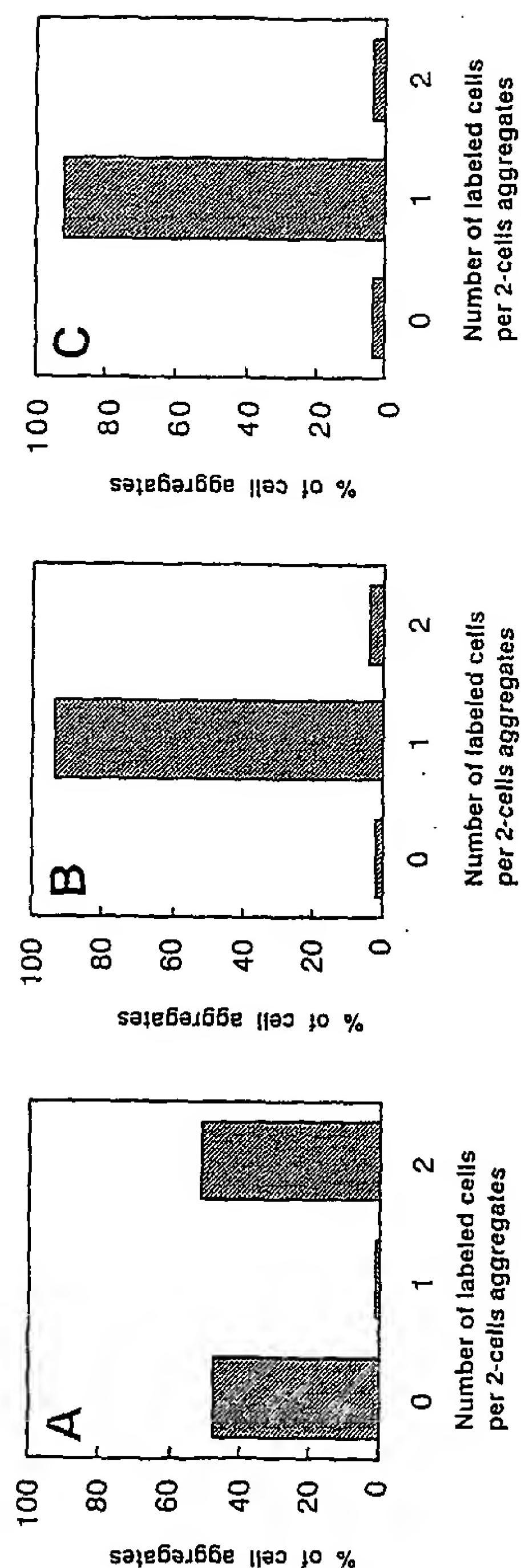


4/10
図 4



5/10
図 5



6/10
図 6

7/10
図 7

A1Blot : α -Nectin-1 Ab 2

kD



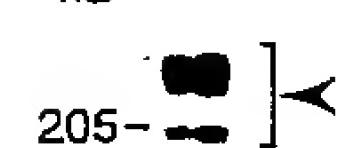
121-

74-

1 2

Blot : α -FLAG Ab

kD



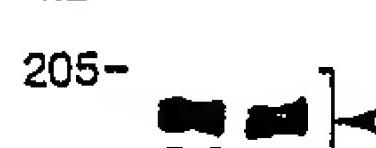
121-

74-

2

A2Blot : α -Nectin-2 α Ab

kD



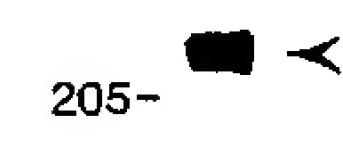
121-

74-

1 2

Blot : α -FLAG Ab

kD



121-

74-

2

B1Blot : α -Nectin-1 Ab 2

kD



121-

74-

1 2 3

Blot : α -FLAG Ab

kD



121-

74-

1 2 3

B2Blot : α -Nectin-2 α Ab

kD



121-

74-

1 2 3

Blot : α -FLAG Ab

kD



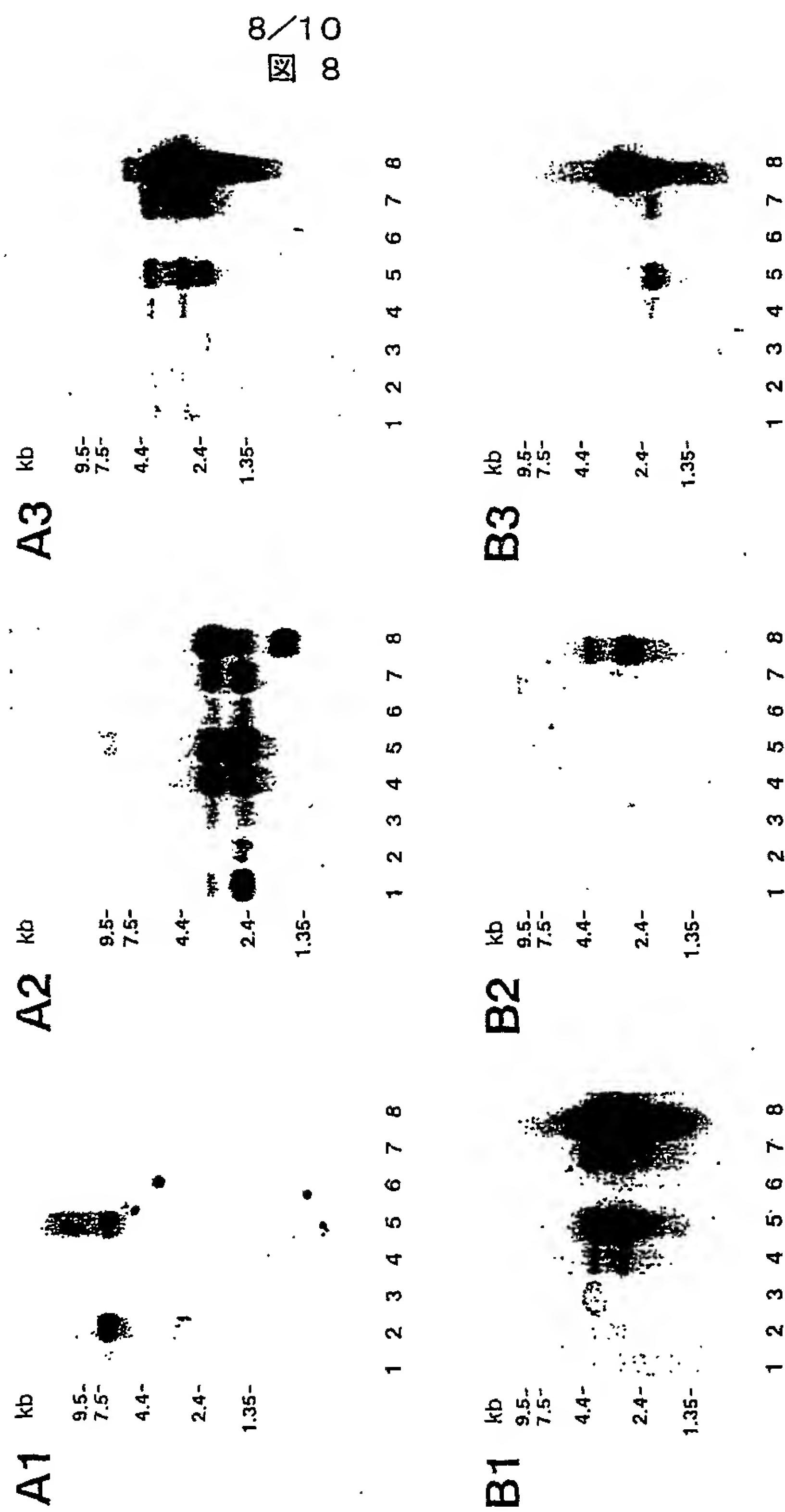
121-

74-

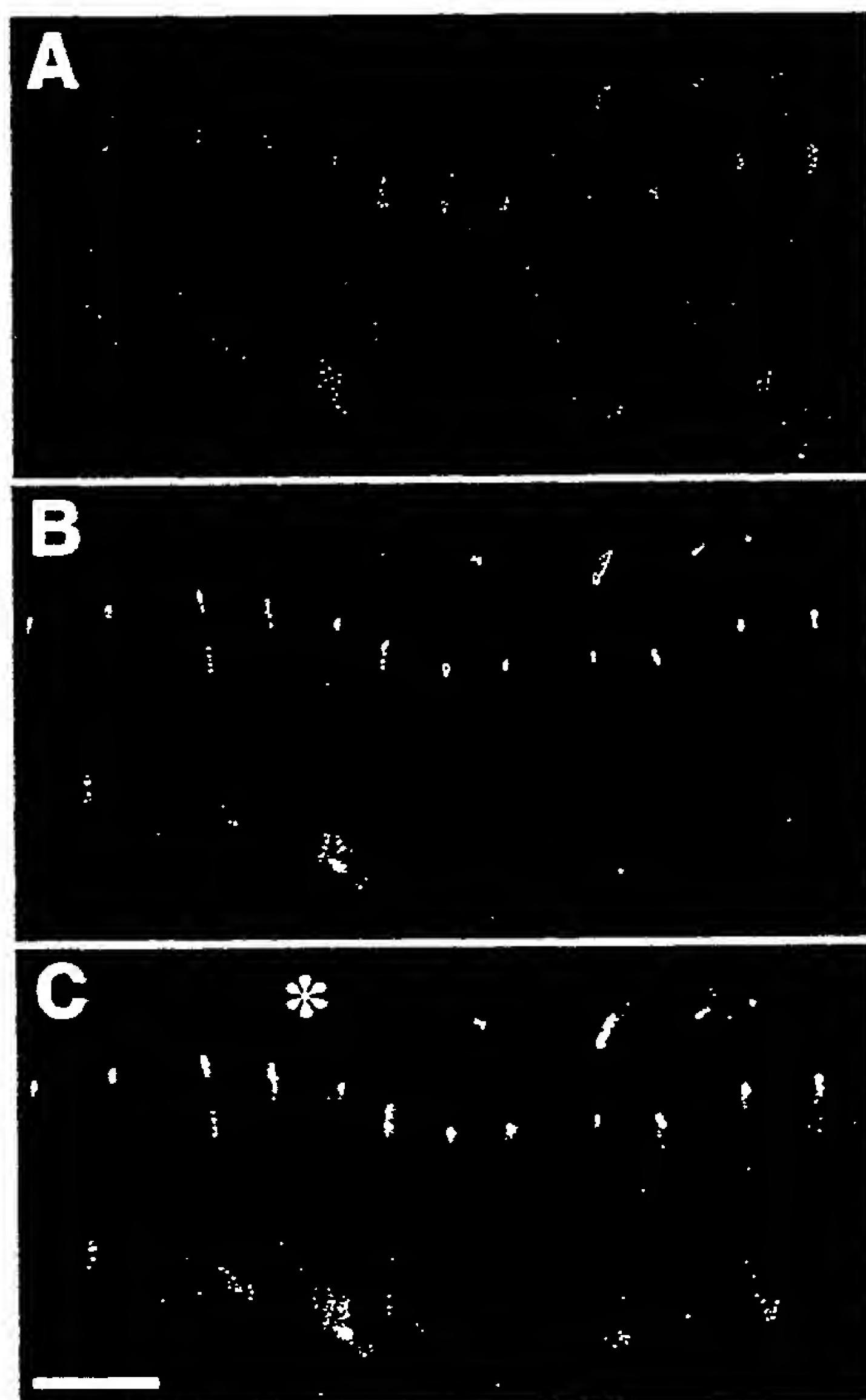
1 2 3

WO 01/66736

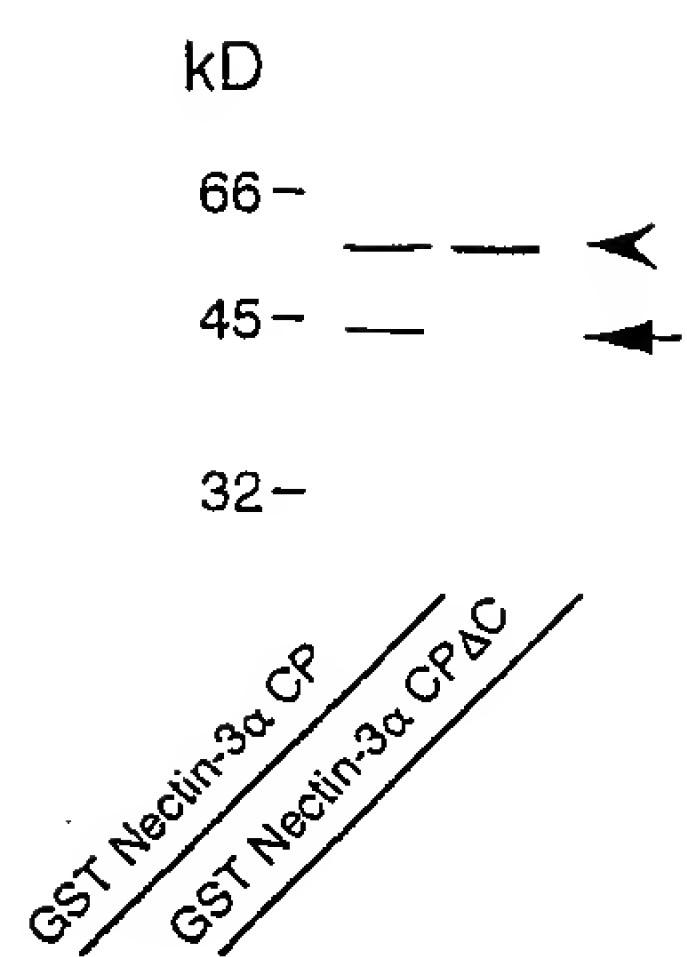
PCT/JP01/01871



9/10
図 9



10/10
図 10



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

5 <120> Protein Nectine-3

<130> 00-F-039PCT/YS

<140>

10 <141>

<150> JP 2000-65595

<151> 2000-03-09

15 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1650

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(1650)

<300>

<301> Satoh-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

<303> J. Biol. Chem.

5 <304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299

<307> 2000-04-07

10 <400> 1

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc cog ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Lys

1

5

10

15

15 gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96

Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro

20 20

25

30

20 gcc ccg acg ccg ccg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt ctc 144

Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu

35

40

45

25 ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca 192

Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro

50

55

60

cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att 240

His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile

	65	70	75	80
	<code>gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc</code> 288			
	Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly			
5	85	90	95	
	<code>aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct</code> 336			
	Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Phe Ser			
	100	105	110	
10	<code>gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt</code> 384			
	Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu			
	115	120	125	
15	<code>aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga</code> 432			
	Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly			
	130	135	140	
	<code>aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc</code> 480			
20	<code>Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser</code>			
	145	150	155	160
	<code>tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa</code> 528			
	Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys			
25	165	170	175	
	<code>ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt</code> 576			
	Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val			

180 185 190
tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
5 195 200 205

gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca 672
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220

10
gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240

15 gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816
20 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
25 275 280 285

ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp

290 295 300
agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat 960
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
5 305 310 315 320

act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tat ggc gtt tat 1008
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
 325 330 335
10
gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt 1056
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
 340 345 350

15 atc tac att tca gat cct cct acc acc acc acc ctt cag ccg aca gtt 1104
Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val
 355 360 365

cag tgg cat tcc tca cct gct gac gtc cag gat ata gca aca gag cat 1152
20 Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His
 370 375 380

aaa aaa ttg ccc ttt cct ttg tca act ttg gca aca ctt aag gat gac 1200
Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp
25 385 390 395 400

aca att ggc acc atc att gct agt gta gtg ggt ggg gct ctc ttc tta 1248
Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu

6/31

	405	410	415	
	gtg ctt gtg agc att tta gct ggg gta ttc tgc tat agg aga cga cgg			1296
	Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg			
5	420	425	430	
	acg ttt cgt gga gac tac ttt gcc aaa aac tac att cca cca tca gac			1344
	Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp			
	435	440	445	
10				
	atg cag aaa gaa tca cag att gat gtt ctt cac cag gat gag ctg gat			1392
	Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln Asp Glu Leu Asp			
	450	455	460	
15	tct tac cca gac agt gta aaa aag gaa aac aaa aat cca gta aac aac			1440
	Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn			
	465	470	475	480
	ctg atc cgc aaa gac tac tta gag gag cct gag aaa act cag tgg aat			1488
20	Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn			
	485	490	495	
	aat gta gag aac ctc act agg ttt gaa aga ccg atg gat tac tat gaa			1536
	Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu			
25	500	505	510	
	gat cta aaa atg gga atg aag ttt gtc agt gat gaa cgc tac aat gaa			1584
	Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu Arg Tyr Asn Glu			

515 520 525
agt gaa gat ggt ttg gtt tct cat gta gat ggc tcc gta att tcc agg 1632
Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg
5 530 535 540

agg gag tgg tat gtc taa 1650
Arg Glu Trp Tyr Val
545 550
10

<210> 2
<211> 549
<212> PRT
15 <213> Mouse

<400> 2
Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Lys
1 5 10 15
20 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
20 25 30
Ala Pro Thr Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
35 40 45
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
25 50 55 60
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly

85 90 95

Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser

100 105 110

Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu

5 115 120 125

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly

130 135 140

Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser

145 150 155 160

10 Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys

165 170 175

Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val

180 185 190

Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly

15 195 200 205

Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr

210 215 220

Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg

225 230 235 240

20 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp

245 250 255

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser

260 265 270

Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn

25 275 280 285

Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp

290 295 300

Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn

9/31

305 310 315 320
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
 325 330 335
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
5 340 345 350
Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val
 355 360 365
Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His
 370 375 380
10 Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp
 385 390 395 400
Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu
 405 410 415
Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg
15 420 425 430
Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp
 435 440 445
Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln Asp Glu Leu Asp
 450 455 460
20 Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn
 465 470 475 480
Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn
 485 490 495
Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu
25 500 505 510
Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu Arg Tyr Asn Glu
 515 520 525
Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg

10/31

530

535

540

Arg Glu Trp Tyr Val

545

5

<210> 3

<211> 1533

<212> DNA

10 <213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1533)

15

<300>

<301> Sato-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

20 <303> J. Biol. Chem.

- <304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299

<307> 2000-04-07

25 <308> GenBank accession No. AF195834

<309> 2000-04-13

<400> 3

11/31

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48
Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Lys
1 5 10 15

5 gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96
Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
20 25 30

gcc ccg acg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt ctc 144
10 Ala Pro Thr Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
35 40 45

ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca 192
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
15 50 55 60

cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att 240
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80

20
gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc 288
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95

25 aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct 336
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110

gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt 384
Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125

5 aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga 432
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140

aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc 480
10 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160

tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa 528
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
15 165 170 175

ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt 576
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val
180 185 190

20 tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205

25 gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca 672
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220 -

gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240

5 gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816
10 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
15 275 280 285

ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300

20

ago agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat 960
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320

25 act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat 1008
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 - 330 335

gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt 1056

Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val

340

345

350

5 atc tac att tca gac atc ccg ctt acg cag acc tca tcc ata gca gtg 1104

Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val

355

360

365

gct gga gcc gtg att gga gct gtc ctg gcc ctc ttc atc atc acc gtc 1152

10 Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val

370

375

380

ttt gtg act gtg ttg ctg acg cct cgg aaa aag aga ccg tcc tat ctt 1200

Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu

15 385

390

395

400

gac aaa gta atc gac ctt cca cct aca cat aag cca ccc cct gta tat 1248

Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr

405

410

415

20

gaa gaa cga att cct tct ctc cct cag aaa gac ctt ctt ggc cag act 1296

Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr

420

425

430

25 gaa cac ttg cct ttg cag act cag ttc aag gag aaa gga gct ggt ggt 1344

Glu His Leu Pro Leu Gln Thr Gln Phe Lys Glu Lys Gly Ala Gly Gly

- 435

440

445

ctt cag ccc tct aat gga cca att agc agg aga ttt gac tat gag gat 1392

Leu Gln Pro Ser Asn Gly Pro Ile Ser Arg Arg Phe Asp Tyr Glu Asp

450

455

460

5 gag agc aca atg caa gaa gat gga act cag cgc atg tgc ccc ctt tat 1440

Glu Ser Thr Met Gln Glu Asp Gly Thr Gln Arg Met Cys Pro Leu Tyr

465

470

475

480

agc cag atg tgc cac caa gac cga agc cct cgc caa cat cac cca cgc 1488

10 Ser Gln Met Cys His Gln Asp Arg Ser Pro Arg Gln His His Pro Arg

485

490

495

aac ccc gag aga ctc tac atc aac cca cga gaa cat tat gtg tga 1533

Asn Pro Glu Arg Leu Tyr Ile Asn Pro Arg Glu His Tyr Val

15

500

505

510

<210> 4

<211> 510

20 <212> PRT

<213> Mouse

<400> 4

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Lys

25

1

5

10

15

Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro

20

25

30

Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu

35 40 45
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
50 55 60
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
5 65 70 75 80
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110
10 Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140
Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
15 145 150 155 160
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
165 170 175
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val
180 185 190
20 Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
25 225 230 235 240
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255
Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser

	260	265	270
	Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn		
	275	280	285
	Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp		
5	290	295	300
	Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn		
	305	310	315
	Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr		
	325	330	335
10	Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val		
	340	345	350
	Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val		
	355	360	365
	Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val		
15	370	375	380
	Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu		
	385	390	395
	Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr		
	405	410	415
20	Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr		
	420	425	430
	Glu His Leu Pro Leu Gln Thr Gln Phe Lys Glu Lys Gly Ala Gly Gly		
	435	440	445
	Leu Gln Pro Ser Asn Gly Pro Ile Ser Arg Arg Phe Asp Tyr Glu Asp		
25	450	455	460
	Glu Ser Thr Met Gln Glu Asp Gly Thr Gln Arg Met Cys Pro Leu Tyr		
	465	470	475
	Ser Gln Met Cys His Gln Asp Arg Ser Pro Arg Gln His His Pro Arg		480

18/31

485 490 495

Asn Pro Glu Arg Leu Tyr Ile Asn Pro Arg Glu His Tyr Val

500 505 510

5

<210> 5

<211> 1317

<212> DNA

10 <213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1317)

15

<300>

<301> Sato-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows
homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

20 <303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299

<307> 2000-04-07

25 <308> GenBank accession No. AF195835

<309> 2000-04-13

· <400> 5

19/31

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48
Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Lys
1 5 10 15

5 gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96
Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
20 25 30

gcc ccg acg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt ctc 144
10 Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
35 40 45

ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca 192
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
15 50 55 60

cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att 240
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80

20 gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc 288
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95

25 aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct 336
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110

gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt 384
Val Gln Gly Asp Tyr Gin Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125

5 aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga 432
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140

aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ott gga aat gct cag tcc 480
10 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160

tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa 528
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
15 165 170 175

ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt 576
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val
180 185 190

20 tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205

25 gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca 672
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220

gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240

5 gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816
10 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
15 275 280 285

ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300

20 agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat 960
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320

25 act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat 1008
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 330 335

gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt 1056
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
340 345 350

5 atc tac att tca gac atc ccg ctt acg cag acc tca tcc ata gca gtg 1104
Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val
355 360 365

gct gga gcc gtg att gga gct gtc ctg gcc ctc ttc atc atc acc gtc 1152
10 Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val
370 375 380

ttt gtg act gtg ttg ctg acg cct cgg aaa aag aga ccg tcc tat ctt 1200
Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu
15 385 390 395 400

gac aaa gta atc gac ctt cca cct aca cat aag cca ccc cct gta tat 1248
Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr
405 410 415

20 gaa gaa cga att cct tct ctc cct cag aaa gac ctt ctt ggc cag gta 1296
Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Val
420 425 430

25 cgt gct ctc gaa gac act taa 1317
Arg Ala Leu Glu Asp Thr
435

<210> 6

<211> 438

<212> PRT

5 <213> Mouse

<400> 6

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Lys

1 5 10 15

10 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro

20 25 30

Ala Pro Thr Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu

35 40 45

Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro

15 50 55 60

His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile

65 70 75 80

Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly

85 90 95

20 Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser

100 105 110

Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu

115 120 125

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly

25 130 135 140

Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser

145 150 155 160

Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys

165 170 175
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val
180 185 190
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
5 195 200 205
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240
10 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255
Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
15 275 280 285
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320
20 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 330 335
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
340 345 350
Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val
25 355 360 365
Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val
370 375 380
Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu

385 390 395 400
Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr
 405 410 415
Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Val
5 420 425 430
Arg Ala Leu Glu Asp Thr
 435

10

<210> 7
<211> 2178
<212> DNA
<213> Mouse

15

<220>
<221> CDS
<222> (197)..(1846)

20 <300>

<301> Satoh-Horikawa K. et al.
<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

<303> J. Biol. Chem.

25 <304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299 -

<307> 2000-04-07

<308> GenBank accession No. AF195833

<309> 2000-04-13

<400> 7

5 gaattcggca cgagcgacgg cggagtcgag gcagccgaga gcgctcggcc gagtggcg 60

ggcggcgac ggccaggag ccgggggttg aggacacgag cgctggccct tccgcgccgc 120

ggccgcggcc gcccggcca cccagggctt gaggcgccgg ggccggggcg agcgggtggg 180

10

cggggcaag gcgggc atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct 232

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro

1

5

10

15 gga egg ggc aaa gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gog gcc gga 280

Gly Gly Gly Lys Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly

15

20

25

ctg ctg ctg ccg gcc ccg acg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att 328

20 Leu Leu Leu Pro Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile

30

35

40

ccc ctg ctt ctc ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att 378

Pro Leu Leu Leu Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile

25 45

50

55

60

att gtg gag cca cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg 424

Ile Val Glu Pro His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu

	65	70	75	
	aag tgt tta att gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag			472
	Lys Cys Leu Ile Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu			
5	80	85	90	
	aag ata cat ggc aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag			520
	Lys Ile His Gly Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gin			
	95	100	105	
10				
	tat gga ttc tct gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa			568
	Tyr Gly Phe Ser Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys			
	110	115	120	
15	aac tat tca ctt aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc			616
	Asn Tyr Ser Leu Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe			
	125	130	135	140
	tca gat tct gga aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga			664
20	Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Ile Gys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly			
	145	150	155	
	aat gct cag tcc tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg			712
	Asn Ala Gln Ser Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val			
25	160	165	170	
	agc ctg ata aaa ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca			760
	Ser Leu Ile Lys Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr			

	175	180	185	
	gta gca gcc gtt tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att			808
	Val Ala Ala Val Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile			
5	190	195	200	
	gac tgg gaa ggt gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt			856
	Asp Trp Glu Gly Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe			
	205	210	215	220
10				
	cct aat gaa aca gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca			904
	Pro Asn Glu Thr Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr			
	225	230	235	
15				
	aga ttt gct cga gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc			952
	Arg Phe Ala Arg Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala			
	240	245	250	
	tta gaa aag gac att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct			1000
	Leu Glu Lys Asp Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala			
20	255	260	265	
	cct gaa gtt tca gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga			1048
	Pro Glu Val Ser Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg			
25	270	275	280	
	aaa ggt gtt aac ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc			1096
	Lys Gly Val Asn Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe			

	285	290	295	300
	aag tcc gtg tgg agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg 1144			
	Lys Ser Val Trp Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu			
5	305	310	315	
	gcg tca gat aat act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat 1192			
	Ala Ser Asp Asn Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr			
	320	325	330	
10				
	tct ggc gtt tat gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt 1240			
	Ser Gly Val Tyr Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser			
	335	340	345	
15	gat caa aag gtt atc tac att tca gat cct cct acc acc acc acc ctt 1288			
	Asp Gln Lys Val Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Leu			
	350	355	360	
	cag ccg aca gtt cag tgg cat tcc tca cct gct gac gtc cag gat ata 1336			
20	Gln Pro Thr Val Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile			
	365	370	375	380
	gca aca gag cat aaa aaa ttg ccc ttt cct ttg tca act ttg gca aca 1384			
	Ala Thr Glu His Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr			
25	385	390	395	
	ctt aag gat gac aca att ggc acc atc att gct agt gta gtg ggt ggg 1432			
	Leu Lys Asp Asp Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly			

400 405 410

gct ctc ttc tta gtg ctt gtg agc att tta gct ggg gta ttc tgc tat 1480
Ala Leu Phe Leu Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr

5 415 420 425

agg aga cga cgg acg ttt cgt gga gac tac ttt gcc aaa aac tac att 1528
Arg Arg Arg Arg Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile

430 435 440

10

cca cca tca gac atg cag aaa gaa tca cag att gat gtt ctt cac cag 1576
Pro Pro Ser Asp Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln

445 450 455 460

15 gat gag ctg gat tct tac cca gac agt gta aaa aag gaa aac aaa aat 1624
Asp Glu Leu Asp Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn

465 470 475

20

cca gta aac aac ctg atc cgc aaa gac tac tta gag gag cct gag aaa 1672
Pro Val Asn Asn Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys

480 485 490

act cag tgg aat aat gta gag aac ctc act agg ttt gaa aga ccg atg 1720
Thr Gln Trp Asn Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met

25 495 500 505

gat tac tat gaa gat cta aaa atg gga atg aag ttt gtc agt gat gaa 1768
Asp Tyr Tyr Glu Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu

31/31

510 515 520
cgc tac aat gaa agt gaa gat ggt ttg gtt tct cat gta gat ggc tcc 1816
Arg Tyr Asn Glu Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser
5 525 530 535 540

gta att tcc agg agg gag tgg tat gtc taa cagccactga cgcgacttca 1866
Val Ile Ser Arg Arg Glu Trp Tyr Val
545 550

10 .

ctatgtacaa ggtttcattc acactagttg accattttca gattgttcat acttttctt 1926

gaggaagaat aagcttttc aagttgattt cgagcttact ttttatattc tgatctgaca 1986

15 aatgaaaatg taaaacctgg gttcaatgta tctgagctgc tttacagttt tcactgctat 2046

actactgtct caagatttaa attctaattgc agagtacttt attggcttgc ggcacacagg 2106

taagaaaat gtcaacgtta aatgtatgac gttttggta caaaaattaa aaaaaaaaaa 2166

20 .
aaaaaaactcg ag 2178

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takahashi K. et al. "an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein" J Cell Biol(1999), Vol.145, No.3, p.539-49	1-9
A	Miyahara M. et al. "Interaction of nection with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction" J Biol Chem(2000), Vol.275, No.1, p.613-8	1-9
A	Asakura T et al. "Similar and differential behaviour between the nection-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of the polarized junctional alignment in epithelial cells" Genes Cells(1999), Vol.4, NO.10, p.573-81	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2001 (27.04.01)Date of mailing of the international search report
15 May, 2001 (15.05.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/01871

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Takahashi K. et al. "an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein" J Cell Biol(1999), Vol. 145, No. 3, p. 539-49	1-9
A	Miyahara M. et al. "Interaction of nection with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction" J Biol Chem(2000), Vol. 275, No. 1, p. 613-8	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27. 04. 01	国際調査報告の発送日 5.05.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 印 4N 9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Asakura T et al. "Similar and differential behaviour between the nection-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of the polarized junctional alignment in epithelial cells" Genes Cells(1999), Vol. 4, NO.10, p. 573-81	1 - 9